

REC'D 02 AUG 2004

WIPO

PCT

PCT/KR 2004/001764

RO/KR 15.07.2004

KR04/1764

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 :
Application Number

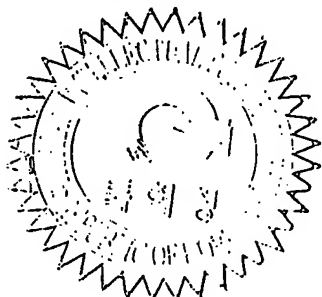
10-2004-0052718

출원 년 월 일 :
Date of Application

2004년 07월 07일
JUL 07, 2004

출원 인 :
Applicant(s)

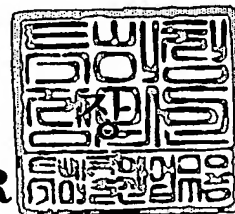
한국생명공학연구원
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology



2004 년 07 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0003
【제출일자】	2004.07.07
【발명의 명칭】	항암 활성을 갖는 신규 2-옥소-아제핀 유도체 화합물 및 이 화합물을 포함하는 암질환 치료를 위한 약학 조성물
【발명의 영문명칭】	Novel 2-oxo-azepine derivative compound and the pharmaceutical composition containing the same for treating cancer disease
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	신동인
【대리인코드】	9-2000-000156-1
【포괄위임등록번호】	2002-083747-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한균희
【성명의 영문표기】	HAN, Gyoon Hee
【주민등록번호】	650615-1162613
【우편번호】	445-983
【주소】	경기도 화성시 태안읍 반월리 현대2차아파트 209동 1702호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김환묵
【성명의 영문표기】	KIM, Hwan Mook
【주민등록번호】	591224-1024118
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 133동 1301호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

박성규

【성명의 영문표기】

PARK, Song Kyu

【주민등록번호】

620201-1405923

【우편번호】

305-720

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103동 903호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이창우

【성명의 영문표기】

LEE, Chang Woo

【주민등록번호】

690814-1351618

【우편번호】

305-721

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 1010동 1202호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

한상배

【성명의 영문표기】

HAN, Sang Bae

【주민등록번호】

690528-1451313

【우편번호】

361-827

【주소】

충청북도 청주시 흥덕구 사직1동 204-8번지

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이기훈

【성명의 영문표기】

LEE, Ki Hoon

【주민등록번호】

630427-1550711

【우편번호】

305-762

【주소】

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 410-1607호 1301호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

고영희

【성명의 영문표기】

KHO, Yung Hee

【주민등록번호】

450420-1025011

【우편번호】	302-170
【주소】	대전광역시 서구 갈마동 343-1
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	천태규
【성명의 영문표기】	CHUN, Tae Gyu
【주민등록번호】	780926-1690713
【우편번호】	305-338
【주소】	대전광역시 유성구 구성동 KAIST 동측 4120호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이진하
【성명의 영문표기】	LEE, Jin Ha
【주민등록번호】	780927-2457511
【우편번호】	301-822
【주소】	대전광역시 중구 선화동 246-7
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양진혁
【성명의 영문표기】	YANG, Jin Hyuk
【주민등록번호】	761221-1459820
【우편번호】	302-747
【주소】	대전광역시 서구 월평동 무궁화아파트 1405동 1203호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	이향우
【출원인코드】	4-1999-027605-7
【발명자】	
【성명】	한정환
【출원인코드】	4-2000-056353-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김용기
【성명의 영문표기】	KIM, Yong Kee

【주민등록번호】	691224-1896411
【우편번호】	440-320
【주소】	경기도 수원시 장안구 율전동 신일아파트 101-203
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이희윤
【성명의 영문표기】	LEE, Hee Yoon
【주민등록번호】	571125-1001210
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 193호 502호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 신동인 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	0 면 38,000 원
【가산출원료】	27 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	3 항 205,000 원
【합계】	243,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	121,500 원

【요약서】**【요약】**

본 발명은 우수한 항암 활성을 갖는 신규 2-옥소-아제핀 유도체 화합물 및 이 화합물을 포함하는 암질환 치료를 위한 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 화합물은 히스톤 디아세틸라아제(HDAC, Histone Deacetylase)에 대해 강한 저해활성을 나타내고, 또한 암세포주에 대해 강한 성장저해작용을 나타내므로, 본 조성물은 암 질환의 예방 및 치료를 위한 약제로써 이용가능하다.

【색인어】

항암, 암질환, 세포성장저해, 히스톤디아세틸라아제

【명세서】

【발명의 명칭】

항암 활성을 갖는 신규 2-옥소-아제핀 유도체 화합물 및 이 화합물을 포함하는 암질환 치료
 료를 위한 약학 조성물{Novel 2-oxo-azepine derivative compound and the pharmaceutical
 composition containing the same for treating cancer disease}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

1> 본 발명은 항암 활성을 갖는 신규 2-옥소 아제핀 유도체(I) 화합물 및 이를 포함하는
 암 질환의 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

2> 암이란 "제어되지 않은 세포성장"으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해
 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는
 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 학문적으로는 신생물(neoplasia)이라고도 불린다. 암
 은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고
 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 전 세계적으로
 암으로 고통받는 환자는 2000만 명이 넘으며, 매년 600만명 이상이 암으로 사망하고 있고,
 2020년경에는 1,100만명이 암으로 사망할 것으로 예측되므로 암은 시급히 그 치료법을 찾아내
 야 할 중요 질환이다. 암은 나라마다 차이는 있지만 선진국이나 우리나라의 경우 전체 사망원
 인의 20% 이상을 차지한다. 하지만 많은 노력에도 불구하고 아직까지 암 발생의 정확한 원인이
 나 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과

외적 요인으로 구분하기도 한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지는 않았으나, 적어도 80-90%가 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자(oncogenes)와 종양억제유전자(tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다.

3> 히스톤(histone)은 유핵세포의 핵 내 DNA와 결합하고 있는 염기성 단백질로서 히스톤의 각 분자 중 특정 위치의 라이신(lysine) 잔기의 ϵ -아미노기(amino group)에서 가역적인 아세틸화(acetylation)가 일어난다. 이러한 히스톤의 아세틸화 반응은 크로마틴 (염색질)의 고차구조 형성이나 세포분열주기 등과 관계가 있어서, 비히스톤 단백질과 함께 유전자의 정보 발현 조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.

4> 생체내에서 히스톤의 아세틸화 상태는 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제(histone acetyltransferase)와 히스톤 디아세틸라아제(HDAC, histone deacetylase)에 의해 평형을 이루고 있으며, 아세틸화수준 변화는 다양한 유전자 발현변화에 필수적인

것으로 알려져 있다. 지금까지 여러 종류의 구조를 가진 히스톤 디아세틸라아제 저해제들이 발표되었다. 히스톤 아세틸화 수준의 변화는 히스톤디아세틸라아제 활성을 억제하는 화합물에 의해 조절될 수 있으며, 현재까지 알려진 이 화합물은 그 구조에 따라서; 1) 지방산 구조(short chain fatty acids); 부티레이트(butyrate) [Newmark et al., *Cancer Lett.* 78, pp1 - 5, 1994], 2) 하이드록사믹 엑시드(hydroxamic acids) 구조 ; 트리코스타틴 A(trichostatin A), 수베로일아닐리드 하이드록사믹 산(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 및 옥삼플라틴(oxamflatin) [Tsuji et al., *J. Antibiot. (Tokyo)* 29, pp1-6, 1976; Richon et al., 95, pp3003-3007, 1998; Kim et al., *Oncogene* 18, pp2461-2470, 1999], 3) 2-아미노-8-옥소-9,10-에폭시데카노일(2-amino-8-oxo-9, 10-epoxy-decanoyl, AOE)를 포함하는 싸이클릭 테트라펩티드(cyclic tetrapeptides) 구조 ; 트라포신 A(trapoxin A) [Kijima et al., *J. Biol. Chem.* 268, 22429-22435, 1993], 4) AOE를 포함하지 않는 싸이클릭 테트라펩티드 구조 ; FR901228 및 아피시딘(apicidin) [Nakajima et al., *Exp. Cell Res.* 241, pp126-33, 1998; Darkin-Rattray et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, pp13143-13147, 1996], 5) 벤자미드(benzamides) 구조 ; MS-27-275 [Saito et al., 96, pp4592-4597., 1999] 등이 있다.

<5> 이러한 화합물들은 인간의 히스톤 디아세틸라아제를 억제하여 히스톤단백질의 과아세틸화를 유도하여 종양억제인자와 같은 특정 단백질 집단을 과다 발현시키고 이로서 암화된 세포의 성장을 억제하거나, 암세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있으며, 동물모델에서도 종양의 성장을 억제한다는 사실이 알려져 있다. 현재까지 이러한 화합물 중 임상 승인을 얻어 사용되고 있는 예는 유일하게 부티레이트 뿐이다. 그러나, 부티레이트는 히스톤 디아세틸라아제를 억제하기 위해서는 높은 농도(밀리 몰 단위, mM)를 필요로 하고, 히스톤 디아세틸라아제 이외에 다

은 효소들도 활성화하는 등 이상적인 화합물이라고는 할 수 없다. 따라서, 저농도(마이크로 몰 단위, μM)에서 히스톤 디아세틸라아제만을 선택적으로 억제할 수 있는 다른 구조를 가진 화합물의 임상 연구가 활발히 진행중이며, 그 중 FR901228은 1상 임상시험 단계(phase I, National Cancer Institute)인 것으로 알려져 있다. 이와 같은 사실에 따라, 히스톤 디아세틸라아제를 선택적으로 저해할 수 있는 화합물은 암세포의 성장 저해 및 사멸을 유도할 수 있는 획기적인 약물로 개발될 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

- ⑥ 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다. 이들 악성종양을 치료하기 위해 사용하는 방법들 중 수술이나 방사선 요법을 제외한 화학요법제를 총칭하여 항암제라고 하며, 주로 핵산의 합성을 저해하여 항암활성을 나타내는 물질이 대부분이다. 화학요법제는 크게 대사길 항제(antimetabolites), 알킬화제(alkylating agents), 유사분열억제제(antimitotic drugs), 호르몬제(hormones) 등으로 분류되며, 암세포의 증식에 필요한 대사과정을 저해하는 대사길항제로는 엽산유도체(methotrexate), 퓨린유도체(6-mercaptopurine, 6-thioguanine), 피리미딘유도체(5-fluorouracil, Cytarabine) 등이 있으며, DNA의 구아닌 등에 알킬기를 도입하여 DNA의 구조를 변형시키고 사슬절단을 시켜 항암효과를 발휘하는 알킬화제로는 니트로젠 머스타드제 화합물(chlorambucil, cyclophosphamide), 에틸렌이민계 화합물(thiotepa), 알킬설포네이트계 화합물(busulfan), 니트로소우레아계 화합물(carmustine), 트리아젠계 화합물(dacarbazine)이 있다. 분열시기 특이성 약물로서 유사분열을 차단하여 세포분열을 억제하는 유사분열억제제에는 악티노마이신 D(actinomycin D), 독소루비신, 블레오마이신, 미토마이신과 같은 항암성항암제, 빈크리스틴, 빈블라스틴과 같은 식물알칼로이드, 탁산환을 포함하는 유사분열 저해제인 탁

소이드 등이 포함된다. 이외에 부신피질호르몬이나 프로게스테론과 같은 호르몬제와 시스플라틴 같은 백금함유 화합물이 항암제로서 사용되고 있다.

7> 화학요법제의 가장 큰 문제는 약제 내성으로써, 항암제에 의한 초기의 성공적인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 약제 내성의 원인을 규명하는 연구와 동시에 기존의 약제에 내성을 지닌 암을 치료하기 위해서는 새로운 기전을 가진 항암제의 개발이 지속적으로 필요하다. 현재 개발이 진행 중인 항암제는 약제 내성 차단제, 혈관신생 억제제, 종양 전이 억제제, 유전자 발현을 표적으로하는 약물 등이 있다. 이들 중 최근 히스톤 디아세틸라아제 효소의 활성을 저해하는 화합물을 항암제로 개발하기 위한 연구가 진행 중이다. 히스톤 디아세틸라아제는 세포에 의한 유전자 발현에 관여하는 효소로서, 암세포의 히스톤 디아세틸라아제를 억제할 경우, 분화, 세포자연사, 세포주기차단과 같은 현상이 일어난다.

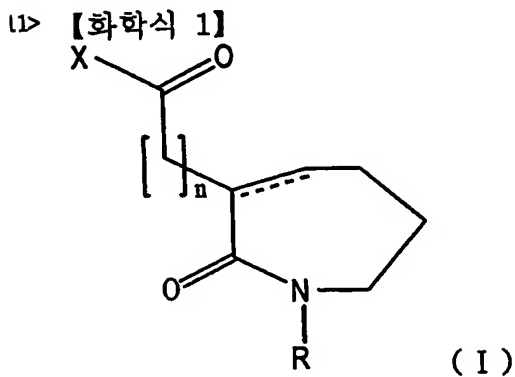
8> 본 발명자들은 히스톤 디아세틸라아제를 작용점으로 하여 종양 세포의 성장에 대해 강한 저해활성을 나타내는 물질을 개발하기 위한 연구를 진행하던 중 본 발명의 2-옥소-아제핀 유도체 화합물이 우수한 히스톤 디아세틸라아제 저해와 종양 세포의 성장 저해활성을 나타냄을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

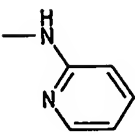
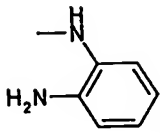
9> 본 발명의 목적은 우수한 항암효과를 나타내는 신규 2-옥소 아제핀 유도체 화합물을 포함하는 암 질환의 치료를 위한 조성물을 제공하는 데 있다.

【발명의 구성】

- 0> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 암 질환의 치료에 유용한, 하기 일반식 (I)의 구조를 갖는 2-옥소 아제핀 유도체 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용가능한 염을 제공한다



- 12> 상기 식에서,

- 13> X는 -OH, -NHOH, -NHCH₂Ph, ,  이고,

- 14> n은 1 내지 5의 정수이고,

- 15> R은 경우에 따라 치환되는 임의의 치환체로서, 수소원자, R'로 치환된 탄소수 1 내지 4의 저급 알킬기, 알케닐기, 알키닐기 또는 알릴기이고,

- 16> R'는 R''으로 치환되거나 비치환된 페닐기이고,

- 17> R''는 할로젠원자 또는 저급알킬기이고,

- 18> 점선(.....)은 단일 결합 또는 이중 결합을 의미한다.

- ▷ 상기 일반식 (I)의 화합물 중에서 특히 바람직한 일군의 화합물들은, 다음과 같은 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 이들의 염을 포함한다:
- ▷ *N*-3-(1-벤질-2-옥소-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-*N*-하이드록시-프로피온아미드 (e1),
- 1> *N*-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-에틸)-2,5,6,7-테트라하이드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(2e),
- 2> *N*-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-프로필)-2,5,6,7-테트라하이드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아마이드(3e),
- 3> *N*-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-부틸)-2,5,6,7-테트라하이드로-1-히드로젠-아제핀-3-일)-프로피온아마이드(4e).
- 24> 또한, 본 발명에서는 상기 일반식 (I)의 화합물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- 25> 상기 일반식 (I)로 표시되는 본 발명의 화합물들은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.
- 26> 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수 혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가

열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

> 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

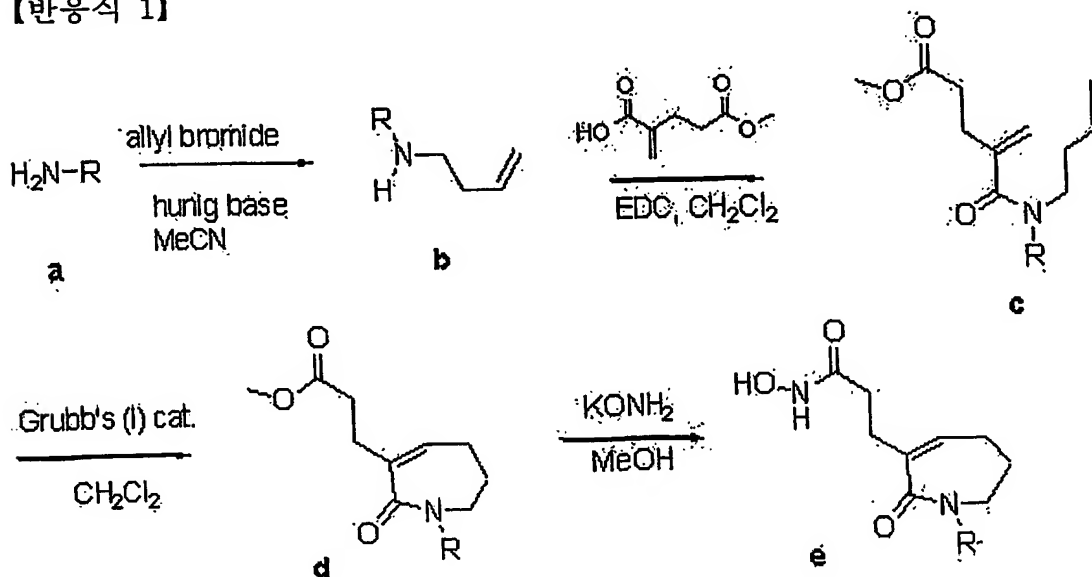
28> 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

29> 상기의 일반식(I)의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 일반식(I)의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트,

메탄설포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

- 본 발명의 다른 목적은 상기 일반식 (I) 화합물의 제조방법을 제공하는 것으로, 하기의 반응식들에 도시된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있지만, 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.
- 하기의 반응식들은 본 발명의 대표적인 화합물들의 제조방법을 제조 단계별로 나타내는 것으로 본 발명의 여러 화합물들은 반응식 1 내지 4의 합성과정에서 사용되는 시약, 용매 및 반응 순서를 바꾸는 등의 작은 변경으로 제조될 수 있다. 본 발명의 몇몇 화합물들은 반응식 1의 범주에 포함되지 않는 과정에 따라 합성되었으며, 이러한 화합물들에 대한 상세한 합성 과정은 이들 각각의 실시예에 설명되어 있다.

32> 【반응식 1】



- > 예를 들어, 상기 일반식 (1) 화합물의 X 치환기가 NH-OH인 화합물은 반응식 (1)에 기재된 바와 같은 상업적으로 쉽게 확보가 가능한 아민 화합물(a)을 출발물질로 하여 화합물(e)를 제조하기 위한 4단계 제조과정으로 제조가능하다.
- 4> 제 1단계에서는 후니그(Hunig) 염기의 존재하에 유기용매 중에서 화합물 (a)를 알릴브로마이드와 반응시켜 화합물 (b)를 제조한다. 이때, 유기용매로는 아세토니트릴(MeCN), 디클로로메탄 등을 사용할 수 있으며, 후니그 염기인 디에틸이소프로필아민을 사용할 수 있다. 후니그 염기는 출발물질인 화합물(a)에 대해 2 내지 3 당량으로 사용될 수 있으며, 이들의 반응은 상온 내지 0 ℃ 범위의 온도에서 수행할 수 있다.
- 35> 제 2단계는, 상기 1단계에서 얻어진 화합물(b)을 1-[3-(디메틸아미노)프로필]-3-에틸카보디이미드 (EDC) 존재하에 유기용매 중에서 모노산과 반응시켜 화합물(c)를 제조한다. 이때, 유기용매로는 메틸렌 클로라이드, 테트라히드로퓨란 등을 사용할 수 있다. 이때, 상기 모노산으로는 2-메틸렌-펜탄디온산-5-메틸 에스테르가 바람직하며, 그 사용량은 화합물(b)에 대해 1 내지 1.2 당량으로 사용될 수 있으며, 이들의 반응은 상온 내지 0 ℃ 범위의 온도에서 수행할 수 있다.
- 36> 제 3단계에서는 상기 화합물(c)을 이어서 루테늄 촉매와 같은 그루브(I) 촉매(Grubb's (I) catalysis)의 존재하에 유기용매 중에서 화합물(d)로 전환시킨다. 이때, 상기 촉매의 사용량은 화합물(c)에 대해 0.02 내지 0.1 당량으로 사용하는 것이 바람직하며, 이들의 반응은 상온 내지 0 ℃ 범위의 온도에서 수행할 수 있다.

- > 이어서, 제 4단계로 상기 화합물(d)을 알콜용매 중에서 아민 염과 반응시켜 본 발명에 따른 화학식의 화합물 중 치환체 X가 -NHOH인 화합물(e)을 수득할 수 있다. 상기 아민 염으로 는 칼륨 히드록시아미드가 바람직하고, 그 사용량은 화합물(d)에 대해 2 내지 3 당량이 바람직 하며, 이들의 반응은 상온 내지 0 ℃ 범위의 온도에서 수행할 수 있다.
- 3> 상기 제조방법으로부터 제조가능한 본 발명의 유도체들은 히스톤 디아세틸라아제에 대해 강한 저해활성을 나타내며 또한 암세포주에 대해 강한 성장저해작용을 나타냄으로써, 우수한 항암효과를 나타내므로, 결과적으로 암 관련 질환을 치료하는데 유용하다.
- 9> 따라서, 본 발명은 상기 일반식 (I) 화합물을 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- 10> 상기 암질환은 폐암, 비소세포성폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암 종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종 양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 등이 있으며, 본 발명의 약학조성물을 암의 치료에 사용할 수 있다.

본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 맥스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테

르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카 카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- ▷ 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.001 ~ 1 중량%의 양으로 존재하여야 한다.
- 6> 또한, 본 발명의 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- 17> 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- 48> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의거하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 만으로 제한되는 것은 아니다.

> 실시예 1. 3-(1-벤질-2-옥소-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-N-하이드록시 -프로피온
아미드 (e1)의 합성

▷ 단계 1. 벤질-펜-4-텐일-아미드 (b)의 합성

> 벤질아민(a)(0.333 mL, 3.05 mmol)의 메틸렌클로라이드 용액에 5-브로모-1-펜텐(0.397 mL, 3.35 mmol)과 디이소프로필에틸아민(0.67 mL, 3.96 mmol)을 교반 상태에서 주입한 후 상온에서 하루 밤 동안 교반하였다. 생성 혼합물을 포화소금물용액으로 세척한 후 유기층을 황산마그네슘으로 건조하고, 감압증류하였다. 얻어진 일차 화합물을 실리카겔 칼럼크로마토그래피 방법(용출제 에틸 아세테이트)으로 정제하여 하기 물성치를 갖는 표제 화합물(b)을 44%의 수율(236mg)로 얻었다..

52> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.35-7.24(m, 5H), 5.92-5.78 (m, 1H), 5.09-4.98 (m, 2H), 3.80 (s, 2H), 2.67(t, $J=7.5$ Hz,), 2.14 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.69-1.59 (m, 2H), 1.41 (br, 1H)

53> 단계 2. 4-[벤질-펜트-4-에닐-카바모일-펜트-4-에논산 메틸 에스테르(c)의 합성

54> 상기 제 1단계에서 얻은 화합물(b)의 메틸렌 클로라이드 0.5 M 용액에 모노산(2-메틸렌-펜탄디온산-5-메틸 에스테르) (320 mg, 2.02 mmol), EDC (340 mg, 2.02 mmol)와 DMAP (50 mg, 0.405 mmol)를 주입한 후 상온에서 5 시간동안 교반하였다. 생성 혼합액을 에틸아세테이트용액으로 희석한 후에 5% HCl 용액 (10 mL)과 포화탄산나트륨 용액 (10 mL)으로 세척하였다. 유기층을 황산마그네슘으로 건조한 후, 감압증류한 다음 얻어진 일차 화합물을 실리카겔 칼럼크로

마토그래피 방법(용출제: 에틸 아세테이트/헥산=1/2)으로 정제하여 하기 물성치를 갖는 표제 화합물(c)을 35%의 수율(150mg)로 얻었다.

> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.31-7.14 (m, 5H), 5.81-5.64 (m, 1H) 5.12 (s, 1H), 5.04-4.97 (m, 3H), 3.65 (s, 2H), 3.56-3.46 (m, 3H), 3.42-3.36 (m, 1H), 3.33-3.31(m, 1H), 2.85(d, $J=3$ Hz, 2H), 2.65-2.45 (m, 4H), 2.07-2.01(m, 2H), 1.69-1.59(m, 2H)

6> 단계 3. 3-(1-벤질-2-옥소-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온산 에스테르(d)의 합성

7> 상기 제 2단계에서 얻은 화합물(c)(150 mg, 0.476 mmol)과 루테늄 촉매(20 mg, 0.024 mmol)의 메틸렌클로라이드 용액 (47.6 mL)을 상온에서 24시간 교반하였다. 용매를 감압 증류하여 얻어진 일차 화합물을 실리카겔 칼럼크로마토그래피 방법(용출제: 메탄올/클로로포름=1/10)으로 정제하여 하기 물성치를 갖는 표제 화합물(d)을 79%의 수율(108 mg)로 얻었다.

58> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.28-7.26 (m, 5H), 5.99-5.94 (m, 1H), 4.63(s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.21(t, $J=6$ Hz, 2H), 2.65(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.48(t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.08-2.01 (m, 2H), 1.67-1.57(m, 2 H)

59> 단계 4. 3-(1-벤질-2-옥소-2,5,6,7-테트라히드로-1H-3-일)-N-히드록시 프로피온 아마이드(e1)의 합성

> 상기 제 3단계에서 얻은 화합물(d)(108mg, 0.376 mmol)의 메탄올 용액에 NH_2OK (메탄올 중의 1.7 M 현탁액, 1.315mL, 2.63 mmol)를 0℃에서 주입한 후 상온에서 3 시간 교반하였다. 혼합액을 초산 (0.020 mL)으로 중화한 후 에틸아세테이트 용액(10 mL)으로 희석하고 고체를 여과한 후 감압증류하였다. 얻어진 일차 화합물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 방법(용출제: 메탄올/클로로포름 =1/10)으로 정제하여 하기 물성치를 갖는 표제 화합물(e1)을 43%의 수율 (46mg)로 얻었다.

1> $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 7.28-7.24 (m, 5H), 6.20-6.02 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.26(d, $J=3$ Hz, 2H), 2.66-2.52 (m, 4H), 2.08-2.05(m, 2H), 1.65-1.64(m, 2H)

32> 실시예 2. N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-에틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드 (2e)의 합성

33> 상기 실시예 1에 기재한 제조방법과 유사한 제조과정을 수행하여 하기 표 1와 같은 물성치를 갖는 N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-에틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(2e)를 제조하였다.

34> 실시예 3.

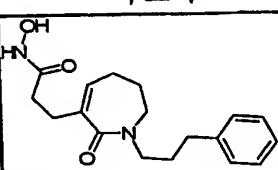
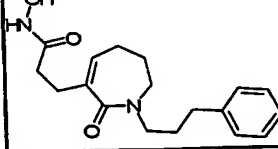
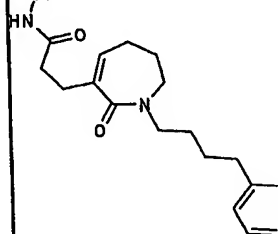
N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-프로필)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(3e)의 합성

상기 실시예 1에 기재한 제조방법과 유사한 제조과정을 수행하여 하기 표 1와 같은 물성치를 갖는 N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-프로필)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(3e)를 제조하였다.

실시예 4. N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-부틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(4e)의 합성

상기 실시예 1에 기재한 제조방법과 유사한 제조과정을 수행하여 하기 표 1과 같은 물성치를 갖는 N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-부틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1H-아제핀-3-일)-프로피온아미드(4e)를 제조하였다.

【표 1】

실시예	구조식	¹ H-NMR 데이터
2		7.3-7.20 (m, 5H), 6.05 (t, J=6 Hz, 1H), 3.70 (t, J=6 Hz, 2H), 3.17 (t, J=6 Hz, 2H), 2.89 (t, J=6 Hz, 2H), 2.58-2.35 (m, 4H), 2.00 (t, J=6 Hz, 2H), 1.74 (t, J=6 Hz, 2H)
3		7.31-7.12 (m, 5H), 6.11-6.05 (m, 1H), 3.50 (br, 2H), 3.25 (br, 2H), 2.76-2.47 (m, 6H), 2.17-2.09 (br, 2H), 1.91-1.88 (br, 2H)
4		7.27-7.13 (m, 5H), 6.07-6.05 (m, 1H), 3.44 (br, 2H), 3.22 (br, 2H), 2.62-2.43 (m, 6H), 2.09-2.07 (br, 2H), 1.84-1.82 (br, 2H), 1.65-1.55 (br, 4H)

> 실험예 1. 약리 활성 실험

> 상기 실시예 1 내지 4 화합물들의 약효를 검색하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

> 1-1. HDAC의 저해도 실험

> 헬라(HeLa) 세포 핵 추출물을 히스톤 디아세틸라아제 효소원으로 사용하고, HDAC 형광활성분석/약물 디스커버리 키트(Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit, Biomol, USA)를 이용하여 본 발명의 화합물들의 히스톤 디아세틸라아제 저해활성을 검사하였다. 이 방법은 방사능을 표지한 히스톤 기질을 이용하는 방법보다 간편한 방법으로서 감도 또한 매우 뛰어난 측정법이다. 히스톤 디아세틸라아제의 기질로는 형광성 히스톤 디아세틸라아제 리실 기질(Fluorogenic Histone Deacetylase Lysyl Substrate)를 이용하며, 히스톤 디아세틸라아제 활성에 의해 아세틸기(acetyl group)가 제거되면, 이 기질이 360 nm의 여기(excitation) 파장에서 460 nm의 방출(emission) 파장의 빛을 내는 원리를 이용한 것이다.

73> 본 발명의 화합물을 각각 농도별 (0.01-10 μ M)로 존재하는 상태에서 히스톤 디아세틸라아제 활성도를 25℃에서 20분간 반응시킨 다음, 전개제(developer)를 동량 가한 후 350 nm의 여기 파장에서 460 nm의 방출 파장을 형광분석기로 측정하였다. IC₅₀ 값은 형광최대값이 절반으로 감소하는 시험 화합물의 농도로 정의하였다.

74> 실험결과를 하기 표 2에 나타내었다(표에서 AA는 IC₅₀'s<1, A는 IC₅₀'s<5, B는 IC₅₀'s<10 및 C는 IC₅₀'s>10을 의미한다).

➤ 하기 표 2에 나타난 바와 같이 히스톤 디아세틸라아제 저해활성을 검색한 결과, 본 발명의 화합물들은 우수한 히스톤 디아세틸라아제 저해활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

6> 1-2. 종양세포의 성장억제실험

7> 사람 전립선 종양세포주 PC-3 (ATCC, 미국)를 10% 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum; FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였다. 항암활성을 측정하고자 할 때는, 5% 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI 1640 배지에 적절한 농도(약 5×10^4 cells/ml)의 세포를 96웰 플레이트에 분주한 후 5% CO₂, 37℃에서 배양하였다. 세포를 분주한 후, 하루가 경과한 다음 화합물들을 처리하기 직전의 세포 농도를 결정하기 위하여 제로시간(Time zero, T₀) 플레이트에 50% 트리클로로아세트산을 웰당 50 μ l씩 넣어 세포들을 고정하고 영점으로 정하였다. 화합물을 처리한 세포들의 경우에는 48시간 이후에 50% 트리클로로아세트산을 웰당 50 μ l씩 넣어 세포들을 고정하였다. 세포에 가해지는 화합물들의 최종 농도는 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 μ g/ml가 되도록 하였다. 고정한 플레이트는 수돗물로 세척하고 건조시킨 후 0.1% 아세트산에 용해된 설펜로다민 B(sulphorhodamine B; SRB)의 0.4% 용액을 웰당 100 μ l를 가하여 세포를 염색하였다. 30 분간 방치한 후에, 0.1% 아세트산으로 세척하고 다시 상온에서 건조시킨 후에 10 mM 트리스 베이스(pH 10.5)를 가하여 염색시약을 용해시켰다. 540 nm에서 측정된 흡광도를 대조군에 대한 백분율로 환산한 후, 암세포의 성장을 50% 억제하는 화합물의 농도(IC₅₀(μ g/ml))를 산출하였다.

<78> 실험결과를 하기 표 2에 나타내었다(표에서 첫 번째 칼럼의 AA는 IC₅₀'s<1, A는 IC₅₀'s<5, B는 IC₅₀'s<10 및 C는 IC₅₀'s>10을 의미하고, 두 번째 칼럼은 아드리아미신(Adriamycin) 대

비 세포성장저해활성으로 AA는 대등 (1-2배), A는 약간 미약 (3-5배), B는 미약 (5-10배) 및 C는 매우 미약 (10배 이상)함을 의미한다).

- ▷ 하기 표 2에 나타난 바와 같이 HDAC의 직접저해와 전립선 종양세포 (PC-3)의 성장저해에 미치는 화합물들의 영향을 측정한 결과, 본 발명의 화합물들이 우수한 암세포의 성장 억제 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

0> 【표 2】

실시예	HDAC 저해활성	세포성장저해 (PC-3)
1	C	C
2	C	C
3	C	C
4	C	C

- 81> 본 발명의 조성물은 아래와 같은 제형으로 투여할 수 있으며, 아래의 제제에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

82> 제제예 1. 산제의 제조

83> 실시예 1 화합물 300 mg

84> 유당 100 mg

85> 탈크 10 mg

86> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

> 제제예 2. 정제의 제조

- > 실시예 1 화합물 50 mg
- > 옥수수전분 100 mg
- > 유당 100 mg
- > 스테아린산 마그네슘 2 mg
- > 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

> 제제예 3. 캡슐제의 제조

- > 실시예 1 화합물 50 mg
- > 옥수수전분 100 mg
- > 유당 100 mg
- > 스테아린산 마그네슘 2 mg
- > 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

> 제제예 4. 주사제의 제조

- > 실시예 2 화합물 50 mg
- > 주사용 멸균 증류수 적량
- > pH 조절제 적량

3> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

4> 제제예 5. 액제의 제조

15> 실시예 3 화합물 1000 mg

16> 설탕 20 g

17> 이성화당 20 g

18> 레몬향 적량

09> 정제수를 가하여 전체 1000 ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

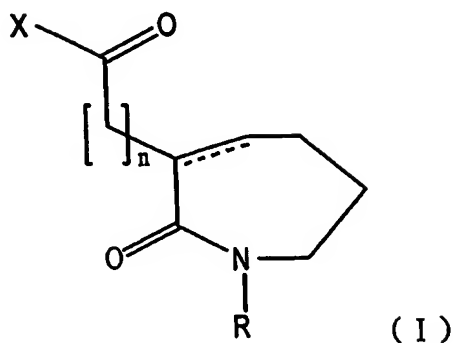
【발명의 효과】

10> 본 발명에 따른 화합물은 히스톤 디아세틸라아제(Histone Deacetylase)를 작용점으로 하여 종양세포에 대한 강한 성장저해활성을 나타냄으로써, 이를 포함하는 조성물은 암 질환 치료를 위한 약제로써 이용가능하다.

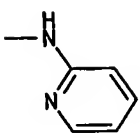
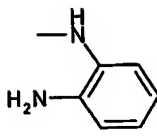
【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 일반식 (I)의 화합물 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염:



상기 식에서,

X는 -OH, -NHOH, -NHOCH₂Ph, , 이고,

n 은 1 내지 5의 정수이고,

R은 경우에 따라 치환되는 임의의 치환체로서, 수소원자, R'로 치환된 탄소수 1 내지 4의 저급 알킬기, 알케닐기, 알키닐기 또는 알릴기이고,

R' 는 R''으로 치환되거나 비치환된 페닐기이고,

R''는 할로젠원자 또는 저급알킬기이고,

점선(.....)은 단일 결합 또는 이중 결합을 의미한다.

【청구항 2】

제 1항에 있어서

N-3-(1-벤질-2-옥소-2,5,6,7-테트라히드로-1*H*-아제핀-3-일)-*N*-하이드록시-프로피온아미드 (e1),

N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-에틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1*H*-아제핀-3-일)-프로피온아미드(2e),

N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-프로필)-2,5,6,7-테트라히드로-1*H*-아제핀-3-일)-프로피온아미드(3e),

N-하이드록시-3-(2-옥소-1-(3-페닐-부틸)-2,5,6,7-테트라히드로-1*H*-아제핀-3-일)-프로피온아미드(4e)로부터 선택된 화합물.

【청구항 3】

제1항의 일반식 (I)의 화합물 또는 그의 약리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암질환 치료를 위한 약학 조성물.

